バンスライク法、Sorensen 法（ホルモール滴定法）及びニンヒドリン比色法で得られるアミノ態窒素の定量値に関する比較研究

岡本　　健*，桁島　紋子*，大田　朋槻*，赤﨑　哲也*

A comparative study on the amino nitrogen values determined by the Van Slyke method, Sorensen method, and ninhydrin colorimetric method

Ken OKAMOTO*, Ayako MATSUSIMA*, Tomoki OTA* and Tetsuya AKASAKI*
*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

As a result of a recovery test of amino nitrogen (AN) for standard amino acids, it was found that the Van Slyke method tended to reflect the total number of amino groups in one amino acid molecule, whereas the ninhydrin colorimetric method seemed to yield the number of α-amino nitrogen groups. The Sorensen (formol titration) method generally gave lower AN recoveries than the other two methods. A comparative study on the AN of several protein hydrolysates, determined by the above three methods, clarified that the Van Slyke method always provided the highest values. For example, for yeast peptones (10 samples), the relative AN values to the Van Slyke AN values, provided by the ninhydrin colorimetric method and the Sorensen method, were in the ranges of 81% to 99% and 66% to 84%, respectively; in the case of casein peptones (four samples), their relative AN values were in the ranges of 88% to 99% and 64% to 89%, respectively. When the amino acid compositions between enzymatic hydrolysates (including autolysates) and acid hydrolysates were compared, different free amino acid compositions were observed even for the same protein origins because of their different hydrolysis mechanisms. In the case of enzymatic hydrolysates (including autolysates), the difference of the AN values between the Van Slyke method and the Sorensen method tended to be larger.

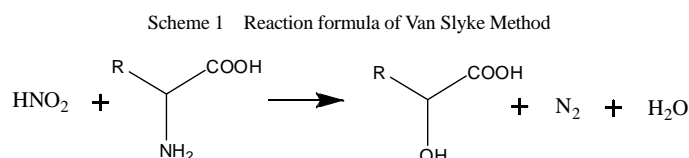
1．緒　　言

たんぱく質加水分解物は、たんぱく質を酸又は酵素により加水分解したものであり、栄養食品、微生物培養時の栄養源等として用いられている。

関税分類において、たんぱく質加水分解物は、その分解の程度によって、関税率表第 3504.00 号-1（ペプトン；協定 2.9%）、第 3504.00 号-2（その他のたんぱく質系物質；協定 5.1%）、第 2106.90 号（その他の調製食料品；基本 12.5%）等に分類され、これらの税率格差は大きく、関税行政を行う上で、輸入品の加水分解の程度を具体的に把握することは重要である。たんぱく質の加水分解の程度の指標としては、試料の全窒素分（TN）に対するアミノ態窒素（AN）の割合（AN/TN）が広く利用されており、税関では、これを上記の分類検討のための重要な要素の一つとしている。

税関分析における AN の定量は、アミノ態窒素自動分析計（バンスライク法）により行われている。この測定法は、試料中のアミノ酸のアミノ基に亜硝酸を作用させ、選択的分解により発生する窒素ガスを定量するもので、有害な腐食性ガスの発生を伴うために、分析者の健康を害する恐れがある。また、JAS 規格の変更により分析需要が無くなったことから、既に現有分析装置の製造及びアフターサービスが終了しており、代替機種も見つからないことから、当該分析法の継続的な実施が困難となっている。また、マニュアル操作で行うバンスライク法は極めて煩雑であり、多検体を扱うルーチン分析には適していない。

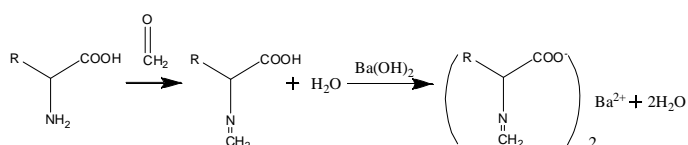
Scheme 1　Reaction formula of Van Slyke Method

$$HNO_2 + R\text{-}CH(NH_2)\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}CH(OH)\text{-}COOH + N_2 + H_2O$$

この様な状況の下、岩下ら[1]は、アミノ酸とニンヒドリンとの反応によって生ずる青紫色の色素の吸光度から AN を定量するニンヒドリン比色法に注目し、数種類のたんぱく質加水分解物の AN を定量した結果、既存の装置（バンスライク法）で測定した

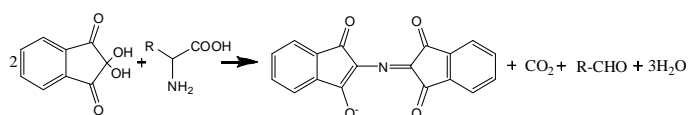
*　財務省関税中央分析所　〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

AN 値の 80%から同程度であったことを報告している。しかしながら、ニンヒドリン試薬は、調製後に長期保存ができないという問題点がある他、検量線の作成方法に関して、Official methods of the Association of Official Analytical Chemists（以下、AOAC 法）に記載の方法 [2] ではグリシンを使用しているのに対し、この研究ではロイシンを使用している。

Scheme 2　Reaction formula of formol titration (Sorensen Method)

$$\mathrm{R{-}CH(NH_2){-}COOH} \xrightarrow{\mathrm{CH_2{=}O}} \mathrm{R{-}CH(N{=}CH_2){-}COOH} + \mathrm{H_2O} \xrightarrow{\mathrm{Ba(OH)_2}} \left(\mathrm{R{-}CH(N{=}CH_2){-}COO^-}\right)_2 \mathrm{Ba^{2+}} + 2\mathrm{H_2O}$$

また、早川 [3] らは、ニンヒドリン比色法に加え、アミノ酸に中性水溶液中でホルムアルデヒドを作用させ、残ったカルボン酸を規定のアルカリ溶液で滴定し、AN を定量する方法であるホルモール法に注目し、試料のアミノ酸組成を考慮した混合アミノ酸による検量線を作成した上で、数種のたんぱく質加水分解物の AN を定量している。しかしながら、アミノ態窒素の定量法として AOAC に記載されている Sorensen 法 [4] などの標準的な分析方法と比較しておらず、ニンヒドリン比色法による結果も、岩下ら [1] の結果と比べて全体的に低いものであった。また、煩雑な操作を要する割にはバンスライク法の数値にそれほど近似するものではなかった。更に、検討された試料は、実際に頻度高く分析される種類のものではなかった。

Scheme 3　Reaction formula of ninhydrin colorimetric method

$$2\,\text{Ninhydrin} + \mathrm{R{-}CH(NH_2){-}COOH} \longrightarrow \text{(Ruhemann's purple)} + \mathrm{CO_2} + \mathrm{R{-}CHO} + 3\mathrm{H_2O}$$

そこで本研究では、7 種類（合計 20 検体）のたんぱく質加水分解物について、現行法（バンスライク法）、Sorensen 法 [4]（及び水酸化ナトリウムを滴定液としたホルモール滴定法）及び Abernathy ら [5] の改良ニンヒドリン比色法により AN を測定し、それらの定量値の比較を行ったので報告する。

また、各試料についての遊離アミノ酸組成比と、各々を塩酸加水分解処理したもののアミノ酸組成比とを比較し、製造工程における加水分解方法の違いによる AN 定量値への影響についても考察した。

2．実　験

2.1　試　料

アスパラギン一水和物、アスパラギン酸、アラニン、アルギニン、イソロイシン、オルニチン塩酸塩、グリシン、グルタミン酸ナトリウム、セリン、チロシン、トリプトファン、トレオニン、バリン、ヒスチジン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、リジン（和光純薬）、グルタミン（日本理化学薬品）、シスチン塩酸塩（東京化成）、ロイシン（ナカライテスク）

たんぱく質加水分解物（輸入品）: 16 検体

カゼインペプトン、大豆ペプトン、肉ペプトン、ゼラチンペプトン（和光純薬）

たんぱく質加水分解物の調製品（輸入品）: 2 検体

2.2　試　薬

2.2.1　バンスライク法

亜硝酸ナトリウム、酢酸（和光純薬）

2.2.2　ホルモール滴定法

ホルムアルデヒド液（37%）、水酸化バリウム、0.1 N 水酸化ナトリウム（和光純薬）

2.2.3　ニンヒドリン比色法

ニンヒドリン、エチレングリコール、酢酸、水酸化ナトリウム（和光純薬）、塩化すず（Ⅱ）二水和物（関東化学）

2.2.4　アミノ酸組成比

6 N 塩酸、アミノ酸混合標準液 H 型（2.5 μmol/ml）、試料希釈用クエン酸ナトリウム緩衝液（pH2.2）（和光純薬）

2.3　装置及び分析条件

2.3.1　バンスライク法

アミノ態窒素自動分析計：SUMIGRAPH N-350（住化分析センター）

反応条件：反応部 45℃、カラム槽 120℃、検出器 TCD

2.3.2　ホルモール滴定法

電位差自動滴定装置：AT-420WIN（京都電子工業）

電極：複合ガラス電極 C-171（京都電子工業）

2.3.3　ニンヒドリン比色法

紫外・可視分光光度計：UV-2550（島津製作所）

2.3.4　アミノ酸組成比

全自動アミノ酸分析機：JLC-500/V2（日本電子）

分離条件：標準加水分解アミノ酸分析モード

2.4　実　験

2.4.1　バンスライク法

ⅰ　試薬の調製（SUMIGRAPH N-350取扱説明書に従い調製した。）

60%酢酸溶液：蒸留水 40 ml と酢酸 60 ml を混合し、10 時間以上静置して溶存空気量を平衡状態にしてから使用した。

40%亜硝酸ナトリウム溶液：亜硝酸ナトリウム 40 g を量り取り、蒸留水 60 ml を加え、溶解させ、1 時間以上静置して溶存空気量を平衡状態にしてから使用した。

ⅱ　標準液の作製

メチオニン約 2.663 g を 250 ml 容メスフラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容し、これを標準原液とした（約 100 mgN/100 ml）。この標準原液 10、25、50、75 ml をそれぞれ 100 ml 容メスフラスコに採り、蒸留水で定容したものを標準液とした。

ⅲ　試料調製

試料（AN として約 50 mg を含有する量）を 100 ml 容メスフ

ラスコに正確に量り取り、蒸留水で定容したものを試料溶液とした。

iv　AN 含有割合の算出

標準原液及び標準液のそれぞれ 100 μl を正確にアミノ態窒素自動分析計に導入し、反応により生じた窒素ガスを測定し、AN 量と窒素ガスのピーク面積値の関係から検量線を作成した。試料溶液についても同様に測定し、作成した検量線と生成した窒素ガスのピーク面積値から AN 含有割合を算出した。

2.4.2　ホルモール滴定法（Sorensen 法 [4)]）

i　試薬の調製

中性ホルムアルデヒド液：ホルムアルデヒド液を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で pH8.4 に調整した。

0.2 N 水酸化バリウム溶液：水酸化バリウム 8 水和物 36 g を蒸留水 1L に溶解させ、ろ紙（No.2）でろ過した後、密封して保存した。

0.2 N 水酸化バリウム溶液の力価の標定 [6)]：0.1 N 塩酸規定液 60 ml をフラスコに採り、フェノールフタレインを指示薬として加え、水酸化バリウム溶液を滴下し、淡桃色を呈したところを終点とした。力価は、水酸化バリウム溶液滴下量より算出した。

ii　アミノ酸溶液の調製

各アミノ酸標準品（AN として約 80 mg を含有する量）を正確に採取し、蒸留水に溶解させた後、200 ml に定容した。（アスパラギン酸、シスチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミンについては、0.05 N 塩酸 20 ml に溶解させた後、蒸留水で定容した。）

iii　測定

アミノ酸溶液の場合は、それぞれ 20 ml をホールピペットで 200 ml 容のビーカーに採取し、蒸留水 60 ml を加え、試料の場合は AN として約 8 mg を含有する量を、200 ml 容のビーカーに正確に量り取り、蒸留水 80 ml を加えて溶解させた。この溶液をマグネチックスターラーで撹拌しながら、電位差自動滴定装置を用いて 0.2 N 水酸化バリウム溶液で pH8.4 に調整した。次に中性ホルムアルデヒド液 40 ml を加え、150 秒間反応させた後、電位差自動滴定装置を用いて 0.2 N 水酸化バリウム溶液を、pH8.4 になるまで滴下し、その滴下量を記録した。

iv　AN 含有割合の算出

AN 含有割合は、中性ホルムアルデヒド液を加えた後の 0.2 N 水酸化バリウム溶液滴下量(ml)から次式により算出した。

AN(%)＝280×力価×滴下量(ml)／試料採取量(mg)

2.4.3　ホルモール滴定法（NaOH 法）

Sorensen 法の 0.2 N 水酸化バリウム溶液を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液に代えて測定し、試料の AN 含有割合は、中性ホルムアルデヒド液を加えた後の 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液滴下量(ml)から次式により算出した。

AN(%)＝140×力価×滴下量(ml)／試料採取量(mg)[7)]

2.4.4　ニンヒドリン比色法

i　ニンヒドリン試薬の調製 [5)]

ニンヒドリン試薬 A 液：ニンヒドリン 4 g にエチレングリコール 150 ml と 4 N 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）50 ml を加えて溶解させた。

ニンヒドリン試薬 B 液：塩化すず（Ⅱ）500 mg にエチレングリコール 5 ml を加えて溶解させた。

ニンヒドリン反応試薬：使用直前にニンヒドリン試薬 A 液とニンヒドリン試薬 B 液を混合（A 液：B 液＝40：1）した。

ii　標準液の作製

グリシン約 107 mg を正確に量り取り、蒸留水で 100 ml に定容し、これを標準原液とした。この標準原液から 2、4、6、8、10 ml を採り、それぞれ蒸留水で 50 ml に定容したものを標準液とした。

iii　試料溶液の作製

各アミノ酸標準品又は試料（それぞれ AN として約 4.8 mg を含有する量）を正確に量り取り、蒸留水で 200 ml に定容し、試料溶液とした。（アスパラギン酸、シスチン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミンについては、0.05 N 塩酸 20 ml に溶解させた後に蒸留水を加えて定容した。）

iv　測定

標準液、試料溶液及び蒸留水（ブランク）について 1 ml をそれぞれ個別の試験管に採り、ニンヒドリン反応試薬 5 ml を各試験管に添加した。沸騰浴中で 30 分間加熱した後、直ちに氷冷し、蒸留水を用いてそれぞれを 50 ml に定容した。その後、4.5 ml のディスポーザブルセル（光路長 10 mm）に移し、測定波長 570 nm の吸光度を紫外・可視分光光度計で測定した。冷却から吸光度測定までは、30 分以内に行った [2)]。

v　AN 含有割合の算出

標準液の AN 濃度とその吸光度の関係から検量線を作成した。この検量線と試料溶液の吸光度から AN 含有割合を算出した。

2.4.5　アミノ酸組成比

i　全アミノ酸測定用試料溶液の作製

試料（たんぱく質として約 5 mg を含有する量）を加水分解用の分解管に量り取り、6 N 塩酸 1 ml を加え、真空ポンプで減圧後に密栓し、110℃で 24 時間加水分解した。その後、分解管中の試料液を蒸留水で洗浄しながらナス型フラスコに移し、エバポレーターを用いて塩酸及び水を減圧留去させた後、試料希釈用クエン酸ナトリウム緩衝液（pH2.2）で 20 ml に定容し、メンブランフィルター（0.45 μm）に通し、試料溶液とした。

ii　遊離アミノ酸測定用試料溶液の作製

適量の試料を量り取り、試料希釈用クエン酸ナトリウム緩衝液（pH2.2）で溶解させ、20 ml に定容した。これを 6000 rpm で 15 分間遠心分離後、その上澄みをメンブランフィルター（0.45 μm）に通し、試料溶液とした。

iii　アミノ酸組成比の算出

アミノ酸混合標準液 H 型（各 2.5 μmol/ml）を 1 ml 採り、試料希釈用クエン酸ナトリウム緩衝液（pH2.2）で 25 ml に定容し、標準液とした。標準液及び試料溶液のアミノ酸含有量を、全自動アミノ酸分析機を用いて全アミノ酸用の条件で測定し、一点検量により、各試料のアミノ酸組成比を算出した。

3．結果及び考察

3.1 各アミノ酸の AN 回収率

各アミノ酸について、ホルモール滴定法（Sorensen 法）及びニンヒドリン比色法により、それぞれの AN を定量し、各アミノ酸分子のαーアミノ窒素量に対する回収率を算出した。得られたデータにバンスライク法による回収率の文献値 [1] を加えたものを Table 1 に示した。

Table 1 Recovery of α-amino nitrogen from each amino acid, determined by three different methods

Amino Acid	Number of Nitrogen and carboxylic acid in Molecule				Recovery of α-Amino Nitrogen, %		
	Total Nitrogen	α-Amino Nitrogen	Other Amino Nitrogen	Carboxylic acid	Van Slyke Method	Formol Titration (Sorensen Method)	Ninhydrin colorimetric Method
Gly	1	1	0	1	105	94	100
Ala	1	1	0	1	101	107	109
Val	1	1	0	1	100	89	103
Leu	1	1	0	1	97	90	105
Ile	1	1	0	1	102	88	104
Phe	1	1	0	1	97	73	95
Tyr	1	1	0	1	86	77	97
Trp	2	1	0	1	104	84	86
His	3	1	0	1	101	50	101
Ser	1	1	0	1	102	72	97
Thr	1	1	0	1	105	68	93
Cys-Cys	2	2	0	2	51	49	55
Met	1	1	0	1	100	76	96
Asn	2	1	1	1	100	56	97
Gln	2	1	1	1	194	69	101
Asp	1	1	0	2	101	92	93
Glu	1	1	0	2	100	86	94
Lys	2	1	1	1	199	170	109
Orn	2	1	1	1	204	146	120
Arg	4	1	1	1	100	62	99
Pro	1	0	0	1	0	68	8

バンスライク法では、アミノ酸分子中のアミノ基の数を反映し、アミノ基を 2 つ持つグルタミン、リジン及びオルニチンの回収率は、約 200%と理論値を大きく超える値となった。これに対し、アミノ基を持たないプロリンは定量できないことが分かった。回収率が著しく低いシステインーシステイン（シスチン）及びプロリンを除くと、平均回収率は 115.7%となり、これは、たんぱく質加水分解物の AN を測定した場合、実際の遊離アミノ酸量よりも高めに評価される可能性を示唆している。

ホルモール滴定法では、リジン及びオルニチンは 100%を大きく超える回収率（それぞれ 170%と 146%）となったものの、これらを除くと、平均回収率 76%であり、全体として低い値となった。

今回のニンヒドリン比色法では、Abernathy ら [5] の半年程度の保存を可能にしたニンヒドリン試薬を用い、AOAC 法 [2] に従ってグリシンで作成した検量線を基に AN を定量した。各アミノ酸の AN 回収率は、岩下ら [1] の測定値に近似しており、アミノ基を持たないプロリンをほとんど定量できないものの、全体として 100%に近い回収率が得られたアミノ酸が多いことが分かる。バンスライク法と同様に、回収率の著しく低かったシスチン及びプロリンを除くと、平均回収率は 99.9%となり、αーアミノ基の数（すなわち、アミノ酸の分子数）に比例した AN 値が得られることを示唆した。

3.2 たんぱく質加水分解物に対しての AN 定量精度

カゼインたんぱく質加水分解物の試料について、バンスライク法、ホルモール滴定法（Sorensen 法）及びニンヒドリン比色法によって AN を定量し、その併行精度を変動係数で比較した。

10 回測定における変動係数は、バンスライク法で 2.04%、ホルモール滴定法（Sorensen 法）で 2.02%、ニンヒドリン比色法で 0.44%となった。いずれの方法においても良好な結果が得られ、中でもニンヒドリン比色法で最もばらつきの少ない測定値が得られた。

Table 2 Amino nitrogen values from various kinds of protein hydrolysates, determined by four different methods (n=3)

sample	Raw Protein	Hydrolysis treatment	Content ratio of amino nitrogen, % (Relative value with Van Slyke Method, %)			
			Van Slyke Method	Formol Titration (Sorensen Method)	Formol Titration (NaOH Method)	Ninhydrin colorimetric Method
1	Yeast	autolysis	7.42	5.95 (80)	5.62 (76)	6.66 (90)
2	Yeast	autolysis	5.34	4.39 (82)	4.48 (84)	5.30 (99)
3	Yeast	autolysis	6.63	4.84 (73)	4.61 (69)	6.07 (92)
4	Yeast	autolysis	6.9	4.84 (70)	5.39 (78)	6.24 (90)
5	Yeast	autolysis	4.97	3.80 (76)	3.47 (70)	4.64 (93)
6	Yeast	autolysis	5.12	4.12 (80)	4.15 (81)	4.82 (94)
7	Yeast	autolysis	2.95	2.14 (72)	2.12 (72)	2.88 (98)
8	Yeast	autolysis	5.97	4.46 (75)	4.59 (77)	5.46 (91)
9	Yeast	autolysis	3.04	1.91 (63)	2.02 (66)	2.47 (81)
10	Yeast	autolysis	3.14	2.06 (66)	2.17 (69)	2.55 (81)
11	Casein	acid	5.63	4.81 (85)	4.99 (89)	5.55 (99)
12	Casein	enzyme	5.84	4.53 (78)	5.14 (88)	5.61 (96)
13	Casein	enzyme	3.93	2.28 (58)	2.63 (67)	3.54 (90)
14	Casein	enzyme	5.43	3.33 (61)	3.49 (64)	4.76 (88)
15	Soybean	acid	3.76	3.24 (86)	3.24 (86)	3.69 (98)
16	Soybean	enzyme	3.06	1.95 (64)	2.08 (68)	3.03 (99)
17	Meat	enzyme	3.62	2.36 (65)	2.37 (65)	3.37 (93)
18	Gelatin	enzyme	2.76	1.62 (59)	1.56 (57)	2.57 (93)
19	Chicken egg yolk	enzyme	3.05	1.36 (45)	1.39 (46)	2.69 (88)
20	Tuna extract	-	1.71	1.14 (67)	1.09 (63)	1.52 (89)

3.3 たんぱく質加水分解物についての AN 定量値の比較

たんぱく質加水分解物 20 検体について、バンスライク法、ホルモール滴定法（Sorensen 法及び NaOH 法）及びニンヒドリン比色法で測定した各 AN の定量結果を Table 2 に示した。カッコ内の数値は、バンスライク法で得られた AN 値を 100 とした場合の相対値を示した。

たんぱく質加水分解物の AN 定量値は、全ての検体において、バンスライク法による値が最も高くなり、ホルモール滴定法による値が最も低くなる結果となった。ホルモール滴定法の値は、Sorensen 法及び NaOH 法のいずれの場合も、バンスライク法の値の 40%～80%程度となり、ニンヒドリン比色法の値は、バンスライク法の値の 80%～同程度となることが分かった。

3.4 原料たんぱく質の加水分解方法と遊離アミノ酸組成について

たんぱく質加水分解物 20 検体についての遊離アミノ酸の組成比と各々を塩酸加水分解して得た全アミノ酸の組成比を Table 3 に示した。

Table 3　Total amino acid and free amino acid compositions of 20 protein hydrolysates

sample	Raw material	Hydrolysis treatment		Amino acid composition, %																
				Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Pro
1	Yeast	autolysis	Total	8.0	4.9	6.0	16.4	8.5	14.5	0.4	7.4	1.4	5.2	7.0	1.1	3.2	2.0	7.2	1.1	5.7
			Free	3.1	6.5	6.5	14.0	6.2	18.9	1.2	9.0	1.9	5.7	9.2	0.9	4.2	2.2	6.9	0.0	3.8
2	Yeast	autolysis	Total	9.5	4.8	5.9	13.5	8.5	11.5	0.5	7.0	1.5	5.2	7.2	2.7	3.5	2.1	6.3	3.8	6.6
			Free	6.2	6.4	7.0	9.5	7.0	14.0	0.4	7.9	1.7	5.7	9.4	3.8	4.8	2.9	4.7	3.8	4.9
3	Yeast	autolysis	Total	9.7	5.4	6.1	17.9	8.1	10.8	0.5	7.0	1.2	4.8	7.4	1.6	3.6	2.0	7.0	4.1	2.7
			Free	5.3	7.3	7.3	16.9	6.2	13.5	0.4	7.8	0.0	5.5	10.1	1.7	5.1	2.7	4.7	3.4	2.1
4	Yeast	autolysis	Total	10.3	5.1	6.6	11.5	8.9	12.3	0.7	7.5	1.5	5.3	7.5	2.8	3.5	2.0	7.0	1.2	6.5
			Free	5.8	7.3	7.4	6.7	6.5	16.0	0.5	9.3	1.9	6.3	10.0	3.8	5.1	2.8	6.0	0.0	4.6
5	Yeast	autolysis	Total	10.4	5.0	6.0	15.2	7.9	12.3	0.5	5.9	1.3	4.7	7.1	2.6	3.3	1.9	6.5	4.1	5.3
			Free	7.1	5.5	4.1	14.7	3.3	16.1	0.6	8.8	2.1	5.8	9.5	3.5	5.7	4.7	3.1	3.0	2.3
6	Yeast	autolysis	Total	10.3	5.0	6.1	15.0	8.7	10.7	0.5	6.7	2.0	4.1	6.9	2.5	3.4	2.2	6.5	3.7	5.9
			Free	6.0	7.2	7.4	10.0	7.5	13.8	0.0	8.0	1.9	5.4	9.0	3.1	4.7	3.0	4.9	3.7	4.4
7	Yeast	autolysis	Total	10.7	4.8	5.5	17.6	11.6	11.1	0.6	6.3	1.3	4.4	6.7	2.0	3.4	2.1	7.3	3.3	1.6
			Free	5.1	1.3	0.2	28.7	1.9	17.1	2.9	6.3	1.6	3.3	7.1	4.7	7.6	5.5	4.7	1.9	0.0
8	Yeast	autolysis	Total	8.9	5.1	5.9	16.4	8.0	13.0	0.5	6.6	1.3	4.9	7.0	2.4	3.3	2.0	6.4	3.4	5.1
			Free	4.1	5.2	5.5	16.4	4.7	18.2	0.5	7.9	1.8	5.3	8.7	3.2	5.0	3.5	4.0	2.7	3.3
9	Yeast	autolysis	Total	5.2	2.6	3.2	39.4	17.8	15.9	2.2	3.0	0.6	1.4	1.7	0.5	1.0	1.0	2.2	2.4	0.0
			Free	1.8	2.1	2.0	54.4	2.1	23.9	1.1	2.9	0.2	0.8	1.5	0.3	1.0	0.7	0.9	3.3	0.9
10	Yeast	autolysis	Total	5.1	2.7	3.6	38.2	16.7	19.6	1.6	2.3	0.0	1.3	1.9	0.5	1.0	1.0	2.4	2.2	0.0
			Free	1.7	2.2	2.4	48.3	1.7	29.2	1.0	2.6	0.3	0.9	1.5	0.5	1.1	0.8	1.0	2.9	1.9
11	Casein	acid	Total	6.7	4.0	5.9	20.4	3.4	5.1	0.0	6.8	2.4	4.8	8.7	1.5	3.3	2.1	6.9	2.6	15.5
			Free	9.2	4.2	7.5	22.4	4.3	6.1	0.0	5.2	2.5	3.2	8.0	0.6	3.5	3.4	6.7	2.5	11.0
12	Casein	enzyme	Total	7.2	4.8	7.0	20.8	3.5	4.8	0.2	8.3	2.6	4.0	8.6	1.0	3.7	2.4	7.0	2.8	11.6
			Free	2.9	6.6	6.0	9.3	1.8	6.2	0.5	8.5	3.9	6.2	16.3	0.5	7.5	3.5	12.2	5.6	2.5
13	Casein	enzyme	Total	6.4	4.5	6.9	19.3	3.4	5.1	0.2	6.4	2.6	4.5	8.8	2.1	3.9	2.4	6.9	2.8	13.9
			Free	1.2	2.8	3.6	4.4	1.1	4.8	1.4	6.0	3.2	3.2	18.7	1.5	12.6	6.7	17.8	11.1	0.0
14	Casein	enzyme	Total	6.5	4.6	7.3	19.9	3.4	4.6	0.2	6.6	2.6	5.1	8.7	2.0	3.9	2.5	6.9	2.8	12.6
			Free	0.0	9.1	3.9	1.5	0.4	3.4	0.7	8.3	4.5	6.7	18.9	1.7	10.9	6.7	15.3	7.9	0.0
15	Soy bean	acid	Total	14.4	3.9	6.5	21.0	7.9	8.7	0.1	4.6	0.7	3.0	5.7	1.3	1.5	1.4	5.8	5.4	8.1
			Free	16.7	4.0	6.8	19.7	8.9	10.2	0.0	3.7	0.7	2.3	5.8	1.3	1.7	1.6	5.4	5.4	5.9
16	Soy bean	enzyme	Total	12.0	4.5	6.6	19.5	8.8	6.2	0.8	4.4	1.4	3.3	7.2	2.6	3.5	2.1	5.5	5.9	5.5
			Free	3.4	5.8	8.6	6.0	13.0	7.4	0.9	1.6	1.0	0.0	14.3	3.3	4.1	7.6	9.2	13.7	0.0
17	Meat	enzyme	Total	5.8	2.5	4.0	10.0	34.0	10.9	0.2	3.0	0.9	1.5	3.4	0.4	1.6	0.9	3.6	5.5	12.0
			Free	3.7	3.9	4.2	7.8	9.1	10.5	0.5	6.8	1.9	6.3	8.4	1.5	5.9	3.4	9.5	16.5	0.0
18	Gelatin	enzyme	Total	5.4	2.0	4.0	8.3	38.7	11.8	0.1	2.4	0.9	1.0	2.6	0.4	1.4	0.8	3.0	5.5	12.0
			Free	3.7	0.5	0.8	0.0	2.8	0.0	2.1	0.0	1.3	9.8	5.1	2.2	10.3	5.0	17.1	39.2	0.0
19	Chicken egg yolk	enzyme	Total	10.0	5.7	8.8	12.1	6.3	8.9	1.0	6.6	2.1	4.5	8.9	3.4	3.4	2.1	6.9	4.6	5.0
			Free	5.6	4.7	8.5	13.3	1.6	3.2	2.9	4.3	1.3	2.3	6.2	6.1	7.9	25.5	6.8	0.0	0.0
20	Tuna extract	-	Total	4.8	3.0	4.1	8.3	28.4	11.4	0.0	2.5	1.5	1.4	2.9	0.6	1.4	9.3	3.6	4.4	12.3
			Free	1.9	0.9	2.3	4.0	3.0	7.6	0.3	2.8	1.4	0.0	3.6	1.8	2.3	61.8	4.5	1.6	0.0

For each sample, the total amino acid composition is shown in the upper line, and the free amino acid composition are shown in the lower line.

製造の際に、酸加水分解を行ったものは、遊離アミノ酸の組成比と全アミノ酸の組成比が近似した。一方、酵素又は自己消化により原料たんぱく質を加水分解したもの（Table 3 の試料番号 1～10，12～14 及び 16～19）は、各々の遊離アミノ酸組成比と全アミノ酸の組成比を比較すると、遊離アミノ酸のうち、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、及びプロリンが減少し、アラニン（特に自己消化によるもの）、ロイシン、フェニルアラニン、ヒスチジン、リジン及びアルギニンが増加する傾向が見られた。

酸による加水分解は、通常、高温で行われるために、トリプトファン、セリン及びトレオニンが分解し、アスパラギンとグルタミンは、それぞれアスパラギン酸とグルタミン酸になることが知られている[8]。一方、たんぱく質の加水分解に使われる分解酵素は通常、あるペプチド結合に特異的に作用するにことが知られており、ペプシンは、アミノ酸鎖のフェニルアラニンあるいはロイシン結合部位を、パンクレアチンは、アルギニン、リジン、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン及びロイシン結合部位を切断する[8]。

この様に加水分解の方法により、アミノ酸鎖の切断様式が異な

り、更にアミノ酸間の変換が生じる場合もあるために、原料たんぱく質が同じでも、製造工程における加水分解法が異なれば、異なる遊離アミノ酸組成比になると予想される。

Table 4　The theoretical recovery of α-amino nitrogen from 20 protein hydrolysate, determined by three different methods

sample	Raw Protein	Hydrolysis treatment	Theoretical recovery of α-Amino Nitrogen, %		
			Van Slyke Method	Formol Titration (Sorensen Method)	Ninhydrin colorimetric Method
1	Yeast	autolysis	103	92	97
2	Yeast	autolysis	100	88	96
3	Yeast	autolysis	103	89	98
4	Yeast	autolysis	101	90	96
5	Yeast	autolysis	100	87	98
6	Yeast	autolysis	101	89	96
7	Yeast	autolysis	101	88	97
8	Yeast	autolysis	100	89	97
9	Yeast	autolysis	99	89	97
10	Yeast	autolysis	99	90	97
11	Casein	acid	96	88	89
12	Casein	enzyme	109	92	98
13	Casein	enzyme	116	94	100
14	Casein	enzyme	114	92	101
15	Soybean	acid	100	90	94
16	Soybean	enzyme	109	87	100
17	Meat	enzyme	109	90	101
18	Gelatin	enzyme	115	86	99
19	Chicken egg yolk	enzyme	103	78	96
20	Tuna extract	-	105	68	101

3.5　たんぱく質加水分解物の AN についての各方法での理論上の回収率

各たんぱく質加水分解物について、Table 3 で得られた遊離アミノ酸の組成比と Table 1 で得られた各アミノ酸の回収率を用いて、アミノ酸組成比と回収率の積（各アミノ酸組成比×各アミノ酸の回収率÷100）を各アミノ酸について算出し、それらを足し合わせることで、各定量方法での理論上の回収率を算出し、その結果を Table 4 に示した。

理論上の回収率は、バンスライク法では 96%～116%（平均値は 104%）で、100%を超えるものが多く、ニンヒドリン比色法では、89%～101%（平均値は 97%）で、100%を僅かに下回るものが多い。一方、ホルモール滴定法は、68%～94%（平均 88%）と低い値を示した。このバンスライク法、ニンヒドリン比色法及びホルモール滴定法により得られた実サンプルの AN 理論回収率の傾向は、Table 2 に示した各アミノ酸についての AN 回収率に関する同三法の傾向と一致する。

3.6　たんぱく質加水分解物の製造工程（加水分解方法）の違いによる AN 定量値への影響

Table 4 の同じ原料たんぱく質由来の加水分解物である試料番号 11～14（カゼイン）及び 15～16（大豆）について、各々の加水分解方法と理論上の回収率に着目して比較すると、バンスライク法とニンヒドリン比色法では、酵素による加水分解で製造された試料の方が、酸加水分解により製造された試料よりも、理論上の回収率が高くなっている。一方、酸加水分解で製造された試料は、他の試料と比べて、ホルモール法とバンスライク法の理論上の回収率の差が減少している。これは、ホルモール滴定法でのみ定量性を示すプロリンが、酸加水分解で増加する傾向にあり（Table 3 参照）、かつ酸加水分解においてグルタミン及びアスパラギンが、それぞれグルタミン酸及びアスパラギン酸に変換されることで、ホルモール滴定法による回収率が、それぞれ 1.6 倍及び 1.2 倍になること（バンスライク法では、回収率がそれぞれ等倍及び 0.5 倍になる。）が要因と考えられる。

この様な加水分解方法の違いによる影響は、実際の AN 定量値においても見られる。Table 2 中の試料番号 11～14（カゼイン）及び 15～16（大豆）の加水分解方法とそれぞれの AN 値について、バンスライク法との相対値で比較すると、特にホルモール滴定法では、酵素による加水分解で製造された試料の相対値は 58～88%であるのに対し、酸加水分解で製造された試料の相対値は 85～89%と、高くなる傾向が認められる。言い換えれば、酸加水分解により製造された試料については、他の方法で製造された試料と比べて、バンスライク法で得られた AN 値とホルモール滴定法で得られた AN 値の差が小さくなる傾向がある。ニンヒドリン比色法については、製造工程における加水分解方法と得られた AN 値の間に相関関係は認められなかった。

3.7　たんぱく質加水分解物の AN 定量値に対する添加物の影響

添加物による影響を調べるために、各方法で 2 種類のたんぱく質加水分解物の調製品の AN を測定した結果を Table 5 に示した。試料番号 21 は、酵母エキスとデキストリンからなり、試料番号 22 は、酵母エキス、デキストリン及び塩化ナトリウムからなる調製品である。

Table 5　Comparison of the amino nitrogen values of prepared protein hydrolysate determined by three different methods (n=3)

sample	Component	Content ratio of amino nitrogen, % (Relative value with Van Slyke Method, %)			
		Van Slyke Method	Formol Titration (Sorensen Method)	Formol Titration (NaOH Method)	Ninhydrin colorimetric Method
21	Yeast extract, Dextrin	1.80	1.15 (64)	1.20 (67)	1.85 (103)
22	Yeast extract, Dextrin, Sodium chloride	2.30	1.35 (59)	1.44 (63)	2.24 (98)

各方法で測定した AN 定量値について、バンスライク法の値を 100 とした場合の相対値で比較すると、ホルモール滴定法で 6 割程度、ニンヒドリン比色法で同等程度の結果が得られた。これらの AN 定量値の違いは、たんぱく質加水分解物のみを測定した場合の傾向と一致する。この結果から、これらの調製品の場合は、AN の定量において、いずれの方法でも添加物による影響が無いことが確認された。

4. 要　　約

様々なたんぱく質加水分解物について、バンスライク法、ホルモール滴定法（Sorensen 法）及びニンヒドリン比色法で AN の定量を行い、それらの比較を行った。その結果、バンスライク法での値が最も高い値となり、例えば、酵母ペプトン（10 検体）では、ニンヒドリン比色法は、バンスライク法の AN 値の 81%～99%、ホルモール滴定法（Sorensen 法）は、バンスライク法の AN 値の 66%～84%であり、カゼインペプトン（4 検体）では、ニンヒドリン比色法は、バンスライク法の AN 値の 88%～99%、ホルモール滴定法はバンスライク法の AN 値の 64%～89%となった。

また、同じ種類の原料たんぱく質であっても、酸加水分解物と酵素又は自己消化による加水分解物とでは、加水分解様式の違いにより、遊離アミノ酸組成比に違いが生じることが分かった。この違いと 3 法の各アミノ酸についての回収率の違いにより、酵素又は自己消化による加水分解物では、ホルモール滴定法とバンスライク法で得られる AN 定量値の差が、より大きくなる傾向があることが分かった。

文　　献

1) 岩下伸行，片山貴之，赤﨑哲也，朝長洋祐：関税中央分析所報，**45**，49（2005）.

2) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1995) 945.30, Free Amino Nitrogen in Wort.

3) 早川彬，河嶋優美，片山貴之，山﨑幸彦：関税中央分析所報，**50**，25（2009）.

4) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1980) 920.154B, Nitrogen (Amino) in Meat.

5) Daniel G. Abernathy,Gary Spedding, Barry Starcher：*Journal of the institute of brewing*, **115(2)**, 122-127 (2009).

6) “*FOOD CHEMICALS CODEX* ”, 4th Ed., P.856 (1996), (National Academy Press).

7) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1970) 2.058, Ammoniacal Nitrogen in Fertilizers.

8) “BD Bionutrients テクニカルマニュアル Advanced Bioprocessing”，第 3 版，P.6（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）

9) “アミノ態窒素測定装置スミグラフ N-350 取扱い説明書”（株式会社　住化分析センター）